

JP00/2216

PCT/JP00/02916

10703065805.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 07 JUL 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 7月14日

4

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第200997号

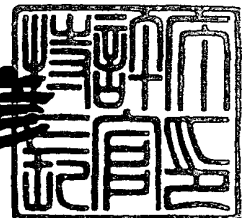
出 願 人
Applicant(s):

財団法人熊本テクノポリス財団

2000年 6月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

出証番号 出証特2000-3047115

【書類名】 特許願

【整理番号】 J990226KT0

【提出日】 平成11年 7月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市水前寺 2-16-20

 【氏名】 山村 研一

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市世安町 55-2-1103

 【氏名】 荒木 喜美

【特許出願人】

 【識別番号】 591023158

 【氏名又は名称】 財団法人熊本テクノポリス財団

【代理人】

 【識別番号】 100099508

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 加藤 久

 【電話番号】 092-413-5378

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 037590

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Cre-loxPを利用した遺伝子トラップ法に用いるトラップベクターであって、loxP配列の左側の反復配列に変異を導入し、右側の反復配列に変異を持つloxと組換えが一旦生じた場合はloxPとの間で組み換えを起こせないようにしたトラップベクター。

【請求項2】 前記変異を導入したloxPが、左側の反復配列にTACC GTTCGTATA（正常ではATAACTTCGTATA）なる変異を導入したものである請求項1記載のトラップベクター。

【請求項3】 前記トラップベクターが、5 側から順にスペーサー、スプライスアクセプター、lox71、IRES、beta-geo、loxP、pUC19、スペーサー、もしくは、5 側から順にスペーサー、lox71、IRES、beta-geo、loxP、pUC19、スペーサーである請求項2記載のトラップベクター。

【請求項4】 請求項1から3に記載のトラップベクターを用いて遺伝子トラップを行う遺伝子トラップ法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子トラップ法によるランダム変異ESクローン技術に関する。

【0002】

【従来技術】

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析は2003年もしくはそれ以前に終了すると言われている。したがって、個々に遺伝子を単離し、構造解析を行なう時代ではなく、ゲノムの「機能解析」の時代に入ったといえる。

【0003】

しかし、ゲノムの塩基配列のみでは、機能に関する十分な情報はなく、機能解析のための新しい解析系が必要である。さらに、ヒトゲノム解析の一つの大きな

目標はヒト疾患の原因遺伝子の解明であるが、原因遺伝子の構造だけでは病気を説明することはできない。また、ヒト患者を用いて実験することはできず、発症機構を解析することはできない。

【0004】

したがって、原因遺伝子の同定後の発症過程の解析と新たな治療法の開発のためには、モデル個体の作製が必須課題となっている。

【0005】

一方、ゲノムを、その構造から遺伝子部分とそれ以外の部分に分けるとすれば、それぞれの別個の機能を有すると考えられ、両者の機能を解析することが必要である(図1)。ゲノム全体から見れば、個々の遺伝子は一部の機能しか果たしておらず、ゲノムは単に遺伝子の集合体ではなく、まだ知られていない機能を有しているとも考えられる。事実、position effect mutationという新しい概念が成立したことからも推察される。

【0006】

遺伝子部分についても、調節領域とコード領域があるが、現在ゲノム機能解析の標的となっているのは、コード領域である。調節領域の機能解析は今後重要になるであろう。なぜなら、ヒトとマウスを比べてみても、遺伝子の種類はほぼ同じである。にもかかわらず、ヒトはヒトでマウスはマウスである。この違いが、蛋白の違いにあるとは思えず、遺伝子発現の調節の違いであろう。発現調節にあらずかる転写因子等は、遺伝子のコード領域の配列から解明できるが、それが結合するエレメントの解析は、一つの遺伝子の調節領域内に多数存在するので、現在のところ極めて困難であるが、細菌人工染色体を用いる方法等が考え得る。

【0007】

コード領域の機能解析は、mRNAレベル、蛋白レベル、細胞レベル、組織・臓器レベル、個体レベルが考えられる。mRNAレベルは、DNAチップで対応できると考えられるが、蛋白以降のレベルの解析を考えると、結局ES細胞を利用するのが最も良い方法と思われる。なぜなら、ES細胞から直接*in vitro*で、各種細胞や組織の誘導系が開発されているものもあるし、今後開発され得る可能性のあるものも多いからである。また、個体レベルの解析系が樹立で

きる利点もあるためである。

【0008】

上記から、ゲノムの機能解析を考える上でも、ES細胞レベルでの遺伝子破壊とそのマウスの作製は極めて重要であることがわかる。これまでは、ES細胞を用いた相同遺伝子組換え法が、遺伝子破壊マウス作製において主役を演じていたが、これを個々の遺伝子破壊マウスを作製するという戦術としてではなく、網羅的に作製するという戦略的な立場からみたとき、大きな欠点がある。

【0009】

第1は、時間がかかりすぎることである。遺伝子破壊マウス作製の律速段階は、ES細胞を用いた相同組換えによるノックアウトESクローンの単離である。1人の熟練した研究者でも、最低3カ月かかるので、年間4遺伝子の破壊がせいぜいである。つまり、10万個の遺伝子にそれぞれ一つの変異を導入するだけで、25,000人×年かかる計算になる。現在世界中で、1年間に約1000系統の遺伝子破壊マウスが作製されていると見積もられているが、これに基づけば250個所で活発に作製していると予想できる。そうであれば、10万種類作製するのに、100年かかることになる。これでは、2003年に終了するといわれているヒトゲノムの構造解析の進展と比較しても、現実的ではない。

【0010】

第2は、コストがかかりすぎることである。1系統の遺伝子破壊マウス作製のため、人件費及び減価償却費を除いても、最低200～400万円必要である。したがって、10万個の単純な遺伝子破壊マウス作製だけで2,000～4,000億円必要となる。

【0011】

以上のように従来のES細胞を用いた相同遺伝子組換えには欠点があること、ゲノムは巨大ではあるが数は決まっていること、遺伝子破壊マウスは将来画期的な薬剤の開発等にも直結し、極めて付加価値が高く、「ランダム」に「大規模」に変異体作製を行なうのが世界の「戦略」となっており、現在のところ、以下に述べる3つの方法が、ランダム変異マウス作製において、もっとも妥当であると考えられている。

【0012】

第1は、変異原物質であるエチルニトロソウレア (ethyl nitroso urea : ENU) を用いる方法である。ENUを成熟雄マウスに投与すると、減数分裂前の精原細胞に作用し、1細胞当たり約50-100カ所に点突然変異をランダムに引き起こす。したがって、1匹の処理マウスを雌マウスと交配することにより、F1世代で多種類の変異マウスを作製できる。1つの遺伝子座につきおよそ1/1,000/配偶子の頻度で、突然変異が起こる。つまり特定の遺伝子座について1,000匹をスクリーニングすれば、1匹はその遺伝子に変異が生じている確率で、極めて効率がよいと考えられている。このENUの場合は点突然変異を惹起できる。

【0013】

第2は、やはり変異原物質であるクロラムブシルを用いる方法である。ENU法と同じ頻度で精原細胞に突然変異を引き起こす。ただし、この場合は時に1メガベースに及ぶ欠失変異が生じる。

【0014】

第3は、遺伝子トラップ法によるものである。プロモーターを有さないマーカー遺伝子を含むトラップベクターをES細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標として未知遺伝子の探索を行なうことを目的として開発された方法である。トラップベクターの組み込みはランダムであり、その組み込みにより殆どの場合内在性遺伝子は破壊される。したがって、そのES細胞を用いてキメラマウスを作製することにより、種々の遺伝子破壊マウスを作製できる。

【0015】

これら変異原物質を用いる方法と遺伝子トラップ法は、それぞれ利点と欠点を有する。(図2)

ENU法は、変異マウスの作製は容易であるが、個々の変異系統の樹立は、交配により分離を行わなければならない。また、変異した遺伝子の同定には、まず多型DNAマーカーを用いた連鎖解析により遺伝子座を同定し、その後にポジショナルクローニング法により遺伝子を単離しなければならない。

【0016】

クロラムブシル法では、やはり変異マウスの作製は容易であるが、欠失部位を同定しなければならず、そのためには多数の多型DNAマーカーを用いて解析する必要がある。また、一般的に、変異原物質法では、大規模の飼育室を必要とする。遺伝子トラップ法は、変異マウスの作製は手間と技術を要するが、変異遺伝子の同定は容易で、飼育室の規模に応じて実験可能である。遺伝子トラップESクローンはそれ自体ゲノム機能解析のための貴重なリソースとなり、この点も他の方法と際立って異なる点である。

【0017】

ENUを用いた方法による大規模な突然変異体作製のプロジェクトがヨーロッパで開始している。ドイツではヒトゲノムプロジェクトの一貫として哺乳類遺伝学研究所のバリング博士を中心として1997年度に開始した。英国においてもスミスクライン社が資金を提供し、HarwellにあるMRCのマウスゲノムセンターにおいてブラウン博士を中心として主に脳・神経系の突然変異マウスを樹立することを目的として開始している。現在までに、両者併せて、優性遺伝を示す変異マウスが約200系統樹立され、予想よりもよい効率でプロジェクトが進行している。米国においてもケースウエスタンリザーブ大学やオークリッジ国立研究所を中心として、膨大な予算（年間60億円）でマウスゲノムの構造解析やENU法による変異体作製が始まることとなった。

【0018】

遺伝子トラップ法についても、世界のいくつかの研究室で変異体作製が始まっている。米国では、民間のレキシコンジェネティクス社がレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップによるランダム破壊を行なっている。しかし、遺伝子をトラップできていても、内在性遺伝子を破壊できているかどうか定かでないこと、生殖キメラマウスが作製できるかどうか不明であること、キメラマウス作製は別料金を要求されること、利用するに当たって膨大な金額を要求しているようであり、一般の研究者にとっては殆ど利用できない状況である。また、ドイツではENUプロジェクトの一貫としても12,000クローンを目標として遺伝子トラップが行なわれている。いずれにしても、マウス系統の樹立よりも、トラップした遺伝子の解析を先行させる方法で進められている。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、従来の遺伝子トラップ法の欠点を克服し、ほぼ理想的と思われる新規の「可変型遺伝子トラップ法」を開発し、この方法を用いて大規模なESトラップクローンの樹立とそれを用いてのマウス変異体作製を行なうことにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究の結果、遺伝子トラップ法にバクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxPを利用することを思いつき、本発明を完成するに至ったものである。ここでCreは組換え酵素であり、loxP配列を認識して、この部位で組換えを起こすものである。

【0021】

従来の遺伝子トラップ法は、トラップベクターをES細胞に導入すると、偶然にランダムにマウス内在性遺伝子に組込まれることを利用する方法である。トラップベクターは、通常スプライスアクセプターのみを有するレポーター遺伝子、薬剤選択マーカー遺伝子、それにプラスミド部分よりなり、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときにのみ、レポーター遺伝子は発現する。逆に、レポーター遺伝子の発現をモニターすることで、内在性遺伝子への組込みを知ることができる。トラップベクターのプラスミドを利用し、トラップした内在性遺伝子を単離でき、またトラップ時にその遺伝子を破壊するので直ちに遺伝子破壊マウスが作製できる。また、レポーター遺伝子はマウス内在性遺伝子の発現調節領域に支配されて発現するので、内在性遺伝子の発現の組織特異性、時期特異性を簡単に解析できる。しかしながら、遺伝子を完全に破壊できても、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば1アミノ酸置換といった変異を導入できないし、またヒト遺伝子と置換することもできないという欠点があった。

【0022】

本発明はこれらの欠点を解消するもので、バクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxPを改変し、それを遺伝子トラップ法に利用する

ことにより、いったん遺伝子トラップベクターの組み込みによりマウス遺伝子を破壊した後、トラップベクター内の変異 10x 部位に、任意の遺伝子を挿入できることとなり、これによって、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば 1 アミノ酸置換といった変異を導入することが可能となり、またヒト遺伝子と置換することも可能となる。

【0023】

10x P は 34 ベースからなる配列で、両端にそれぞれ 13 ベースの逆反復配列があり、中央に 8 ベースのスペーサーと呼ぶ配列がある。バクテリアの中では、2 カ所の 10x P 間で組換えが起こり、挿入または削除反応が起こる。哺乳類細胞で、挿入反応を起こすことができれば、あとで任意の遺伝子を挿入できるので、応用性は格段に広がるが、哺乳類細胞では核が大きいと、一旦削除された 10x P を持つ環状 DNA は拡散してしまい、挿入反応は殆ど観察されない。

【0024】

挿入反応を起こすために、10x P 配列に変異を導入し、挿入されれば削除できないようにすることを考え、このため 2 種類の変異型 10x P を準備した。

【0025】

一つは、左側の反復配列に TACCGTTTCGTATA なる変異（下線部が変異させた部分。正常では、ATAACTTTCGTATA）をいれたもので、10x 71 と名付けた。もう一つは、右側の反復配列に TATACGAACGCGTA（下線部が変異させた部分。正常では、TATACGAAGTTAT）なる変異を持つもので、10x 66 と名付けた。ゲノム上の 10x 71 とプラスミド上の 10x 66 との間で組換えが起こると、挿入された DNA の左側には 10x 71 / 66 (TACCGTTTCGTATA GCATACAT TATACGAACGCGTA) が、右側には野生型の 10x P (ATAACTTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT) がくことになる。こうなると、Cre はもはや 10x 71 / 66 を見分けることができず、10x P との間で組換えを起こせず挿入されたままとなる（図 3）。

【0026】

実際に ES 細胞にあらかじめ 10x 71 を組込んでおき、そこへ 10x 66 を

含むプラスミドを導入すると、プラスミドが組込まれることが分かった。したがって、この10x71をあらかじめ遺伝子トラップベクターに組込んでおけば、あとでいかなる遺伝子でも10x66を用いて挿入することが可能となった。つまり、小さな変異を導入した遺伝子やヒトの遺伝子で置換することも可能となった。

【0027】

この10x71を利用した遺伝子トラップベクターU8を構築した(図4、図5参照)。U8の基本部分は、pGT1.8IRESbeta geoに由来している。このpGT1.8IRESbeta geoは、マウスEn-2遺伝子由来のスプライスアクセプター、IRES、beta-geoを含んでいる。このpGT1.8IRESbeta geoのBglII部位に10x71を組み込んだあと、SalIで処理し、SalI断片を用意しておく。一方、pUC19ベクターに180塩基対のスペーサー配列(ウサギベータグロビン遺伝子に由来するが、これはトラップベクターがマウスゲノム中に組み込まれるときに大事な部分が失われないよう両端を保護するために用いられるので、配列が何であっても構わない)、10xP、ポリAシグナルを組み込み、プラスミドpEBN-Set iを作製する。

【0028】

このプラスミドのSalI部位に、上記のSalI断片を挿入し、U8を作製した。したがって、この構造は、5'側から順にスペーサー、スプライスアクセプター、10x71、IRES、beta-geo、10xP、pUC19、スペーサーである。また、スプライスアクセプターを削除したベクターU8deltaも同様の手順で作製した。10xPの左端の反復配列に変異を入れた10x71をレポーターであるbeta-geoの前に、10xPを後ろに接続したのは、ベクターが組込まれたのちに、Creを一過性に発現させることで、中間のIRESとbeta-geo部分を完全に除去できるからである。この結果、プラスミドpUC19が上流にあるマウス内在遺伝子の近傍に位置することになり、その単離が容易になる。

【0029】

このベクターを用い、第1段階で通常の遺伝子トラップを行なう。これにより、まず内在性遺伝子の破壊ができ、このES細胞を用いて遺伝子破壊マウスが作製できる。また、内在性遺伝子を単離した後に、大腸菌の中で部位特異的変異導入法等の方法でこの遺伝子に微細な変異を導入し、これをプラスミド上で10x66の下流につなぐ。これを先のES細胞に導入すれば、第2段階で10x71部位にこの改変した遺伝子を導入できる(図6)。この方法では、改変した内在性遺伝子のみならず、ヒト遺伝子で置換することも可能で、あらゆる遺伝子を方法を導入可能である。これを可変型遺伝子トラップ法と名付けた。

【0030】

(スクリーニング系)

遺伝子トラップベクターをES細胞に導入しネオ体制クローンを選別すれば、これらはマウス内在性遺伝子の下流にトラップベクターが組み込まれているクローンであるとみなされる。これらのクローンからDNAを抽出し、サザンブロット法により解析し、トラップベクターが1コピーのみが組み込まれているクローンを選択する。この選択方法を用いることにより、効率良くマウス遺伝子をトラップしているクローンを選択できることがわかったので、これをスクリーニング系として用いる。

【0031】

(遺伝子トラップ変異体作製の手順(図7))

1) ネオ耐性クローンの単離

トラップベクター100マイクログラムを電気穿孔法(バイオラッドGene Pulserを用い、800V, 3microFの条件下)にて0.8mlのリン酸緩衝液中に浮遊させた3000万個のTT2 ES細胞に導入し、200マイクログラム/mlの濃度のG418存在下で培養する。1週間後に、ネオ耐性クローンを単離する。

2) 組込みパターンによるESクローンの選別

ESクローンから常法にしたがってDNAを抽出し、サザンブロット法により組込みパターンを解析する。1コピーのみが組込まれているものを選別する。これは、プラスミドによるマウス内在性遺伝子の単離を容易に行なえるクローンを

選別するためと、1コピーでネオ体制となるクローンでは、実際にマウス遺伝子をトラップしている確率が極めて高いからである。

3) キメラマウス作製によるトラップ系統の樹立

選別したES細胞をICRマウス由来の桑実胚と凝集させ、キメラマウス胚を作製し、これらを不妊雄と交尾し偽妊娠状態となった仮親の子宮に移植する。これらは標準的な方法で行う。約17日後にマウスが生まれるが、キメラマウスを選別し、正常な雌と交配し、F1をえて変異マウス系統を樹立する。系統樹立ができたもののみについて以下の解析を行なう。

4) 精子と2細胞期胚の凍結保存

F1からの精子とそれを用いて体外受精を行ない、2細胞期胚となったところで、これらを超急速凍結法にて凍結保存しておく。

5) 発現パターンの解析

F1マウスを交配し、9.5日胚と成体における発現パターンを解析する。

6) 表現型の解析

樹立したマウス系統について、ヘテロ及びホモマウスの表現型を解析する。表現型の解析は、肉眼的な観察、解剖による内部の観察、各臓器の組織切片、X線撮影による骨格系、行動や記憶、血液を用いて行う。

7) トラップした遺伝子の単離と構造解析、染色体地図の作成

トラップクローンからマウスDNAの単離と塩基配列の決定を行ない、ホモロジーサーチを行なう。その結果について、既知遺伝子、EST、未知遺伝子、リピートに区別しておく。ESTと未知遺伝子については、染色体地図を作成する。染色体地図は、蛍光in situ hybridization (FISH) 法またはマイクロサテライトプローブ等を用いた連鎖解析によって行なう。染色体上の位置が明らかになれば、既存の変異マウスの位置と対比し、一致するかどうか調べておく。

8) データベース構築

樹立した各系統について、マーカー遺伝子の10日胚と成体における発現パターン、F1およびF2マウスにおける表現型、トラップしたマウス内在性DNAの塩基配列、ESTと未知遺伝子についてはその染色体上の位置について、デー

データベースを作成する。

【0032】

(パイロットスタディの結果)

(1) 全体の効率

1) 胚様体形成によるスクリーニング

ネオ耐性クローン 106 個を、浮遊培養し、胚様体を形成させ、ES 細胞の段階、及び分化誘導後の 2 点で b-gal の発現を解析した。その結果、90 個 (86%) のトラップクローンは、いずれかの時期で発現していた。

2) 単一コピーの組込みを示すクローンの選別

胚様体形成過程での遺伝子発現を示した 109 個のトラップクローンについて、DNA を抽出し、挿入パターンを解析した。その結果、76 個 (70%) は単一コピーの挿入であり、そのうち完全なものが 27 個 (25%)、pUC 部分が欠失したものが 38 個 (35%) であった。pUC が欠失しても、lox71 部位を利用すれば pUC は再び挿入できるので、これら 65 個 (60%) のクローンについて利用できることが分かった。

3) 生殖キメラ作製効率

上記のトラップクローンを用いてキメラマウスを作製したが、約半数のクローンにおいて生殖キメラマウスが得られた。

4) 全体の要約

最初に選択したネオ耐性クローンの約 26% のものが最終段階にまで至ることが分かった。生殖キメラ作製効率は現在上昇しているので、もう少し全体の効率をあげることができると考えられるが、現時点でも十分研究の実施には差し支えないほどのよい効率であると考えられる。

【0033】

(2) 遺伝子トラップ法の効率

これまでのパイロットスタディの結果、24 トラップ系統を樹立した。遺伝子レベルの解析まで進んだものは 13 系統であり、塩基配列を Blast program を用いて Genebank および EMBL データベースと比較した。その結果、9 クローンが既知遺伝子、3 クローンが EST、残り 1 クローンが未

知遺伝子であった。これまで他の研究者による報告では、10-25%が既知遺伝子、10-20%がEST、50-80%が未知遺伝子、2-10%がリピートである。

【0034】

(3) トラップされた遺伝子

胚様体形成によるスクリーニング法により、発生や細胞増殖に関連する遺伝子を効率よくトラップしているかどうかを、既知遺伝子の種類を調べることで検討した。その結果、転写因子であるCBP (CREB binding protein) やSp1、細胞周期に関与するcyclin B2、シグナル伝達に関与するCrkとpHPS1-2、翻訳に関与するrRNA、suil、hnRNPL、RNA polymerase I、そしてミトコンドリアDNAであった(図8)。それぞれよく知られた遺伝子がトラップされていることが分かった。これらの多くは、細胞増殖に関与する遺伝子であり、胚様体形成によるスクリーニング系が、よく機能していることを示唆している。

【0035】

(4) トラップによる遺伝子破壊の確認

遺伝子トラップにより、実際に内在性遺伝子が破壊されるかどうか重要なポイントの一つであるので、6つの既知遺伝子について、トラップ部位の構造を解析した。その結果、1つはプロモーター領域、1つはエクソン内に、4つはイントロン内に挿入されており、すべてにおいて遺伝子が完全または部分的に破壊されていた。したがって、遺伝子トラップ法により効率よく内在性遺伝子を破壊できることが明らかとなった(図9)。

【0036】

【発明の効果】

(1) 効率良く遺伝子破壊マウスが作製できる

遺伝子トラップベクターはES細胞のゲノム上にランダムに組み込まれる。したがって、単にトラップベクターをES細胞に導入しただけでは、必ずしも遺伝子の中に組み込まれるわけではなく、遺伝子とは関係のない場所にも組み込まれる。しかし、トラップベクター内には薬剤耐性遺伝子であるネオ耐性遺伝子が含

まれているので、それが発現している細胞は、ネオマイシン（G418ともいう）耐性となる。逆に言えば、ネオマイシン存在下で生存する細胞は、ネオ耐性遺伝子を発現していることになる。トラップベクター内のネオ耐性遺伝子は、ES細胞で発現しているマウスの遺伝子の下流に組み込まれないと発現しない。したがって、発現するということは、マウスの遺伝子の下流に組み込まれたことを意味する。トラップベクターのマウス遺伝子への組み込みにより、ほとんどの場合マウス遺伝子は破壊される。したがって、このES細胞を利用すれば、マウス遺伝子の破壊マウスを作製できることになる。すなわち、ネオ耐性クローンの選択と1コピーのトラップベクターの組み込みクローンの選別により、効率良く遺伝子破壊マウスを作製できることになる。通常の相同組換えによる方法では、1人の研究者が1年間にせいぜい4遺伝子の破壊マウスしかできないが、ここで用いる方法によれば、1週間に6系統、1年間に40週間働いたとして、合計240系統も樹立でき、60倍の効率である。

【0037】

（2）詳細な遺伝子機能の解析ができる

ここで開発した可変型遺伝子トラップ法では、後で自在に遺伝子を挿入できる。したがって、あらかじめ機能を持つと思われる遺伝子の各部分に変異を導入しておき、それを導入したマウスを作製し、その表現型を解析することにより、遺伝子の各部分の持つ機能が容易に解析できる。

【0038】

（3）よりヒトに近い疾患モデルマウスが作製できる

上記から、ヒトの疾患で発見されたのと同じ突然変異を持つヒト遺伝子をマウス遺伝子に置換して導入できるので、よりヒトに近い疾患モデルマウスが作製できる。

【0039】

参考文献

（1）遺伝子トラップに関連したもの

- 1) Wurst, W., Rossant, J., Prideau, V., Kownacha, M., Joyner, A., Hill, D. P., Guille

mot, F. , Gasca, S. , Cado, D. , Auerbach, A. and Ang, S. -L. A large scale gene trap screen for insertional mutations in developmentally regulated gene in mice. *Genetics* 139 889-899, 1995.

2) Chowdhury, K. , Bonald, P. , Torres, M. , Stoykova, A. and Gruss, P. , Evidence for the stochastic integration of gene trap vectors into the m/sue germline. *Nucleic Acids Res.* 25: 1531-1536, 1997.

3) Hicks, G. G. , Shi, E. , Li, X-M. , Li, C-H. , Pawlak, M. and Ruley, H. E. Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis. *Nature Genetics* 16: 338-344, 1997.

4) Zambrowicz, B. P. , Friedrich, G. A. , Buxton, E. C. , Lilleberg, S. L. , Person, C. and Sands, A. OT. *Nature* 392: 608-611, 1998.

(2) Cre-loxPに関連したもの

1) Sauer, B. and henderson, N. Smt e-specific DNA recombination in mammalian cells cy the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 85: 5166-5170, 1988.

2) Lakso, M. , Sauer, B. , Mosinger, Jr. , B. , Lee, E. J. , Manning, R. W. , Yu, S. -H. , Muller, K. L. and Westphal, H. Targeted onc

ogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 6232-6236, 1992.

3) Gu, H., Zou, Y-R. and Rajewsky, K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced 1993.

4) Albert, H. Dale, E., Lee, E. and Ow, D. W. Site-specific integration of DNA into wild type and mutant loxP sites placed in the plant genome. Plant J. 7: 649-659, 1995.

5) Schwenk, F., Baron, U. and Rajewsky, K. A Cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. 23: 5080-5081, 1995.

(3) 遺伝子トラップ関連文献リスト (山村研一、Yamamura, K.)

1) Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K., and Yamamura, K., Expression vector system based on the chicken b-actin promoter directs high-level production of interleukin-5. Gene 79:269-277, 1989.

2) Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Efficient production of highly ex

pressing transfectants with a novel expression vector. Gene 108:193-200, 1991.

3) Niwa, H., Araki, K., Kimura, S., Taniguchi, S., Wakasugi, S., and Yamamura, K. An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events. J. Biochem. 113: 343-349, 1993.

4) Niwa, H., Abe, K., Kunisada, T. and Yamamura, K. Cell-cycle-dependent expression of the STK-1 gene encoding a novel murine putative protein kinase. Gene 169: 197-201, 1996.

5) Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abe, S., Abe, K. and Yamamura, K. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. Exp. Cell Res. 229:27-34, 1996.

6) Araki, K., Araki, M. and Yamamura, K. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. Nucleic Acid Res. 25:868-872, 1997.

7) Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y. and Yamamura, K. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison

ri son of various promoters. J. Biochem. 122: 977-982, 1997.

8) Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K. and Yamamura, K. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: Implication of a dominant negative mechanism. Human Mol. Genet. in press.

9) Oike, Y., Takakura, N., Hata, A., Kaname, T., Arai, K., Akizuki, M., Yamaguchi, Y., Yasue, H., Yamamura, K. and Suda, T. Mice homozygous for a truncated form of a CREB-binding protein (CBP) exhibit defects in hematopoiesis and vasculogenesis. Blood in press.

【図面の簡単な説明】

【図1】 ゲノム機能解析を示す図である。

【図2】 変異原物質法と遺伝子トラップ法の比較を示す図である。

【図3】 変異型loxPによるDNA断片の挿入を示す図である。

【図4】 トラップベクターpU-Hachiの構造を示す図である。

【図5】 U8トラップベクターの作製手順を示す図である。

【図6】 可変型遺伝子トラップ法を示す図である。

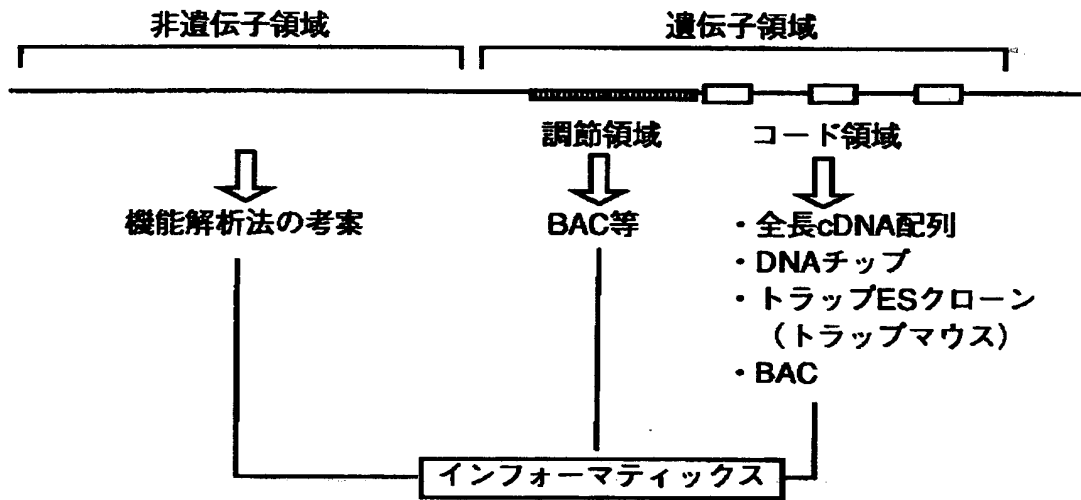
【図7】 トラップ変異体作製を示す図である。

【図8】 トラップされた遺伝子を示す図である。

【図9】 トラップベクターの組込位置を示す図である。

【書類名】 図面

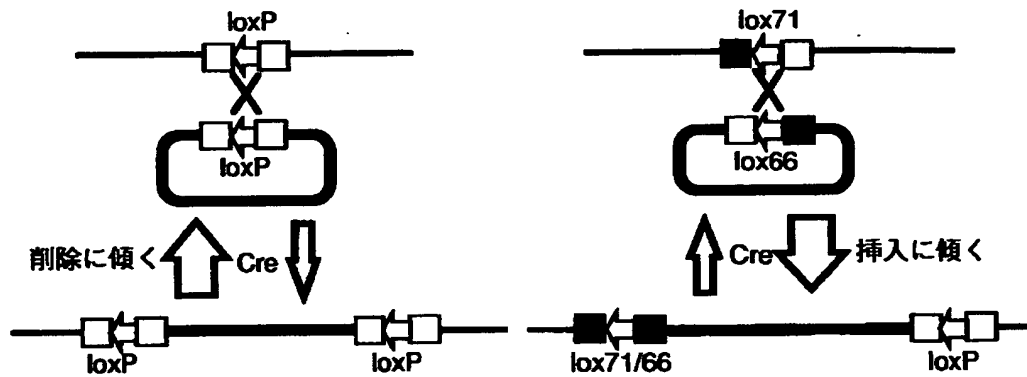
【図 1】



【図 2】

	ENU法	クロラムブシル法	遺伝子トラップ法
変異の性質	点変異	欠失変異	自在の変異
変異マウス作製	容易	容易	困難
変異遺伝子同定	困難	中程度	容易
その他の特徴			ESトラップクローンの利用が可能

【図 3】



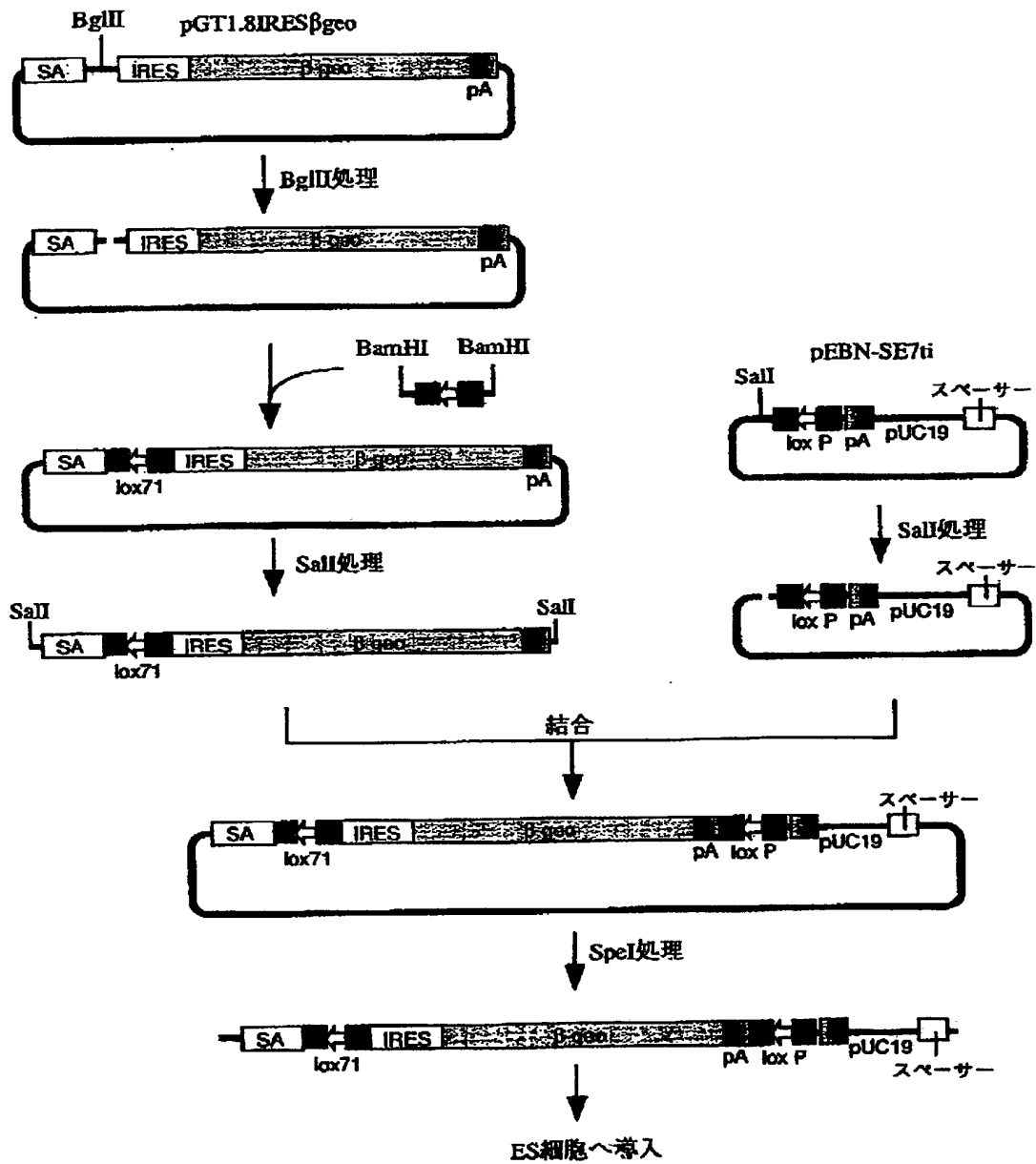
左側は正常、右側は変異型のloxを用いたときの組換えの反応。左側では切り出されたloxPを含む環状DNAが物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側にlox71および環状DNA側にlox66を用いると、組み込まれたときに生じるlox71/66をCreリコンビナーゼは認識できにくくなり、削除反応より挿入反応側に傾く。

【図 4】

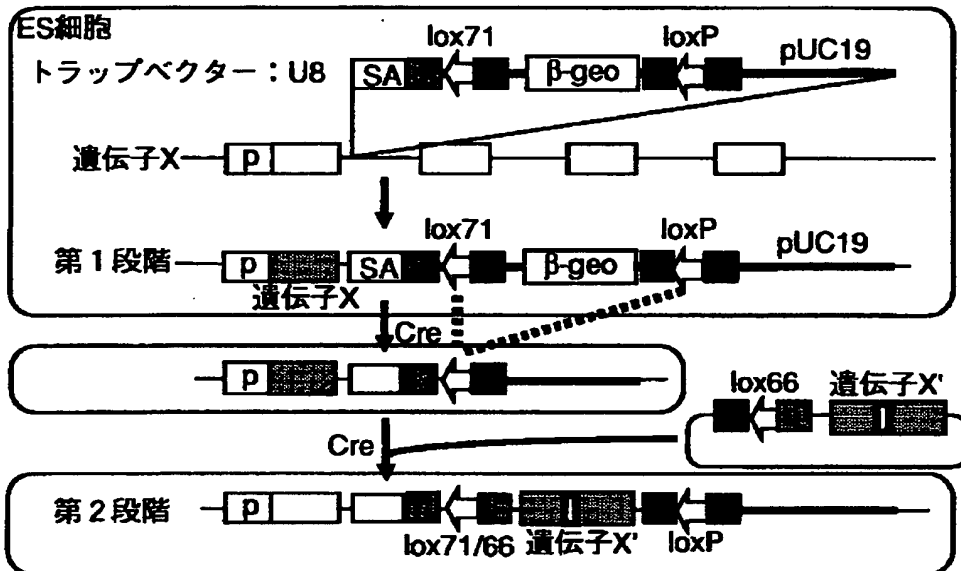


スペーサーの配列は何でもよく、スプライスアクセプター (SA) が削れて挿入されないためのもの。IRES (internal ribosomal entry site) があると、そこから翻訳が開始するので、 β -geoのタンパクができる。

【図 5】

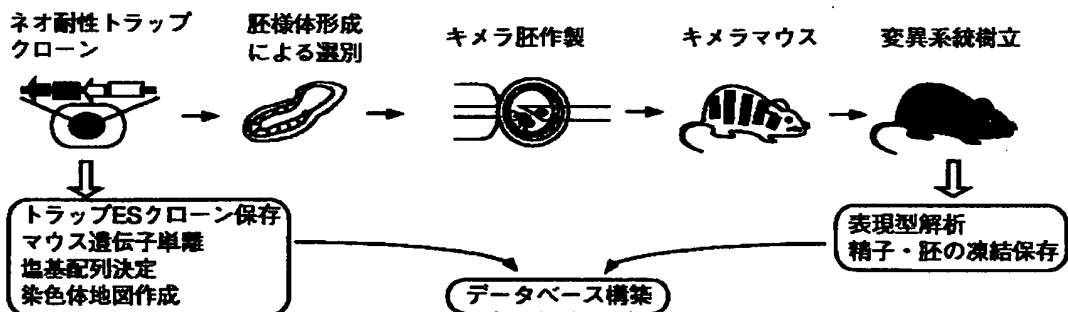


【図6】



U8トラップベクターを用いて、第1段階で通常の遺伝子トラップを行なう。このESにより遺伝子破壊マウスが作製できる。内在性遺伝子を単離した後、その遺伝子に小さな変異を導入し、lox66の下流につなぐ。第2段階では、これをlox71に挿入できる。

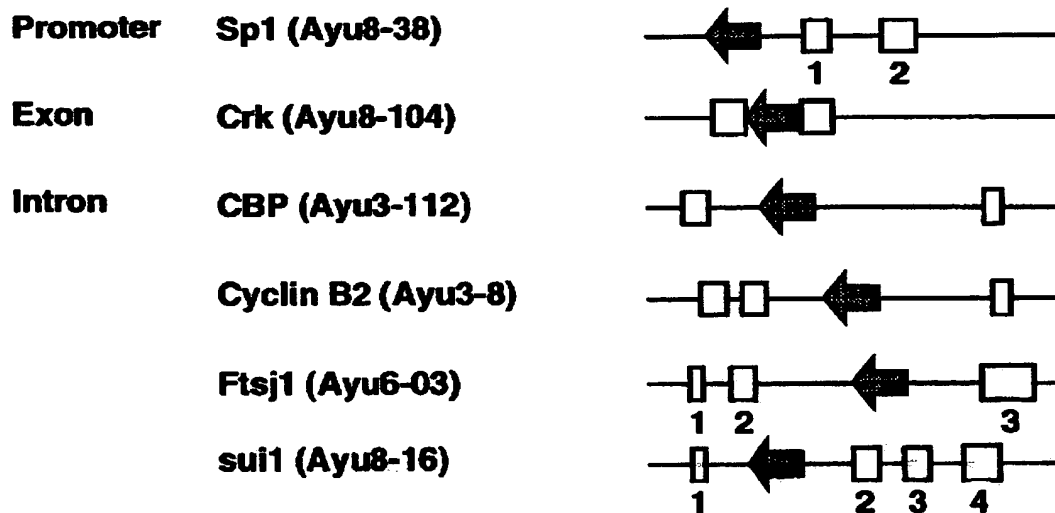
【図7】



【図 8】

クラス	クローン番号	遺伝子
1. 核		
(1) 転写	Ayu3-112	CBP
	Ayu8-038	Sp1
(2) 細胞周期	Ayu3-008	Cyclin B2
	Ayu6-003	大腸菌の細胞分裂タンパクであるFtsj1に相同
(3) シグナル伝達	Ayu8-104	Crk
	Ayu8-025	pHPS ₁ -2
(4) 細胞骨格	Ayu8-003	dynamin II
2. 細胞質		
(1) 翻訳	Ayu3-022	rRNA
	Ayu8-016	sui1
	Ayu8-016	hnRNP Lの上流
	Ayu8-019	RNA polymerase Iの可能性大
(2) その他	Ayu3-001	Mt DNA
3. 未知	Ayu7-003	unknown

【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な可変型遺伝子トラップ法を開発し、この方法を用いて大規模な ES トラップクロンの樹立とそれを用いてのマウス変異体作製を行なう。

【解決手段】 $1 \times P$ 配列の左側の反復配列に変異を導入し、右側の反復配列に変異を持つ $1 \times$ と組換えが一旦生じた場合は $1 \times P$ との間で組み換えを起こさないようにしたトラップベクターを用いて遺伝子トラップを行う。

【選択図】 図 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591023158]

1. 変更年月日 1991年 1月14日

[変更理由] 新規登録

住 所 熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10

氏 名 財団法人熊本テクノポリス財団